



PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAÎTE DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12Q 1/68, 1/18, 1/02		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/28571 (43) Date de publication internationale: 19 septembre 1996 (19.09.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00391			(81) Etats désignés: AL, AM, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet AR IPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet O API (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) Date de dépôt international: 13 mars 1996 (13.03.96)			
(30) Données relatives à la priorité: 95/03230 15 mars 1995 (15.03.95)		FR	
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): SOCIETE FRANCAISE DE RECHERCHES ET D'INVESTISSEMENTS (S.F.R.I.) [FR/FR]; Berganton, Saint-Jean-d'Illac, F-33127 Martignas-sur-Jalles (FR).			Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont requises.</i>
(72) Inventeurs; et			
(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): PROVOT, Christian [FR/FR]; 110, rue de Cugnaux, F-31300 Toulouse (FR). SALLES, Bernard [FR/FR]; 4, rue Compans, F-31500 Toulouse (FR). FOURNIÉ, Gilbert [FR/FR]; 88, boulevard Deltour, F-31100 Toulouse (FR). CALSOU, Patrick [FR/FR]; 37, avenue des Avions, F-31400 Toulouse (FR).			
(74) Mandataire: POUCHUCQ, Bernard; Cabinet Thebault, 1, allées de Chartres, F-33000 Bordeaux (FR).			

(54) Title: METHOD FOR THE QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETECTION OF DNA DAMAGE

(54) Titre: PROCEDE DE DETECTION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DE LESIONS DE L'ADN

(57) Abstract

A method for the qualitative and quantitative detection of damages to DNA, characterised in that it includes the steps of binding the target DNA to a sensitised substrate, subjecting the DNA to the action of a test composition comprising at least one damage-generating product, subjecting the DNA to the action of a composition containing at least one cell extract active in repairing the DNA and containing markers, and detecting directly or indirectly the markers optionally incorporated into the DNA, if the repair has been effective, wherein a washing step is included between said steps and the binding and damaging steps can be reversed. The invention also provides a method for capturing the DNA directly from the cells with a lysis solution and a method for determining the repair modulation effect of some molecules. Said method is suitable for detecting DNA damage and the repair inhibition modulating activity of one or more molecules.

(57) Abrégé

L'objet de l'invention est un procédé de détection qualitative et quantitative de lésions sur de l'ADN, qui se caractérise en ce qu'il comprend les différentes étapes suivantes: fixation de l'ADN cible sur un support sensibilisé, action d'une composition à tester comprenant au moins un produit lésant, action d'une composition comprenant au moins un extrait cellulaire possédant une activité réparatrice sur cet ADN, ledit extrait contenant des marqueurs, révélation directe ou indirecte des marqueurs éventuellement incorporés dans l'ADN, en cas de réparation; lesdites étapes étant séparées par au moins une étape de lavage, les étapes de fixation et de lésion pouvant être inversées. L'invention a également pour objet le procédé de capture de l'ADN directement à partir de cellules avec une solution de lyse, et un procédé de détermination de l'effet modulateur de la réparation de certaines molécules. Application à la détection de lésions de l'ADN et de l'action modulatrice d'inhibition de réparation d'au moins une molécule.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lithuanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

PROCEDE DE DETECTION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DE LESIONS DE L'ADN

La présente invention a pour objet un procédé de détection qualitative et quantitative de lésions sur de l'Acide DésoxyriboNucléique dues à des agents physiques ou chimiques ainsi qu'un procédé de détection qualitative et quantitative de l'activité de substances modulatrices de réparation d'extraits cellulaires sur de l'Acide DésoxyriboNucléique lésé.

Pour la suite de la description et pour les revendications, on appelle "produit lésant", tout agent chimique pur spécifique, tout mélange artificiel d'agents chimiques, ou toute composition naturelle d'agents chimiques ou encore tout agent physique tel que les rayonnements notamment les rayonnements ionisants et les rayonnements ultraviolets.

On sait que l'ADN sert de support à l'information génétique et qu'il peut être lésé par des produits lésants avec des conséquences importantes si ces lésions ne sont pas réparées. En effet, la division cellulaire est dépendante de ces informations et la vie même de la cellule est concernée puisque les gènes exprimés dans la cellule sont nécessaires au bon fonctionnement cellulaire.

Aussi une lésion peut conduire à une mutation sur l'ADN, qui peut entraîner un dysfonctionnement de la cellule et par conséquent induire un problème au niveau de l'organisme.

Il est donc important d'analyser les réactions de l'ADN d'un individu vis à vis de produits lésants pour en tirer des informations intéressantes, notamment pour le suivi de l'évolution de certaines maladies ou pour en prévenir les conséquences. Il faut donc, à partir de cellules contenues dans le 5 sang ou dans un quelconque tissu, récupérer l'ADN puis le purifier et analyser son comportement en regard des produits lésants en dosant les conséquences induites par ces lésions.

Ainsi, dans l'industrie du médicament, on peut avoir besoin de déterminer qualitativement et quantitativement la génotoxicité ou l'anti-10 génotoxicité d'un composé ou d'un mélange de composés vis à vis de l'ADN, et si possible les capacités de réparation des lésions ainsi générées. Une telle détermination est utile à partir de cellules développées et cultivées *in vitro* ou isolées *ex vivo*. Des applications de ce type de détermination sont la détection de xénobiotiques génotoxiques, le suivi des patients en 15 chimiothérapie, ou le suivi des personnes travaillant au contact des génotoxiques.

Il est un autre but du procédé selon l'invention qui, dans le cas d'agents lésants chimiques, cherche à vérifier les capacités d'inhibition d'un composé vis à vis de ce produit, c'est notamment le cas des oxydants et 20 antioxydants.

On connaît différents tests concernant l'ADN et notamment la demande de brevet EP 0.472.482 au nom du présent demandeur, qui concerne le dosage de microquantités d'ADN présentes en position extracellulaire dans un liquide biologique, notamment dans le plasma sanguin. 25

Ce procédé consiste à fixer, par adsorption, l'ADN sur un support solide grâce à des substances présentant une grande affinité pour l'ADN. Ainsi on peut choisir cette substance notamment parmi les complexes macromoléculaires cationiques.

Le support solide est généralement une plaque de microtitration 30 comprenant des puits, qui sont sensibilisés par incubation dans un milieu contenant ces complexes macromoléculaires cationiques.

Cette plaque est incubée avec l'échantillon dont on cherche à doser la proportion d'ADN. L'ADN est adsorbé et la plaque est lavée en tampon Borate avec un tensioactif ou en tampon tris(hydroxyméthyl)aminométhane.

L'ADN ainsi fixé est soumis à une réaction de biologie moléculaire 5 mettant en jeu plusieurs enzymes spécifiques de l'ADN afin d'incorporer au moins un nucléotide marqué chimiquement par une substance pouvant être ultérieurement révélée, par exemple par réaction enzymatique.

Une telle incorporation est prévue dans ce procédé antérieur de dosage par la réaction de "Nick translation", c'est-à-dire par une réaction de 10 déplacement de coupure haplotomique. Un tel marqueur, décrit dans cette demande précédente, est un nucléotide modifié reconnu par un composé avidine/enzyme ou streptavidine/enzyme, l'enzyme étant la peroxydase.

Après interruption de la réaction enzymatique, la révélation du marqueur incorporé est obtenue au moyen d'un appareillage susceptible de 15 quantifier le signal émis. On mesure ainsi au moyen d'un spectrophotomètre la réaction colorée obtenue avec la biotine.

Un tel procédé de dosage de l'ADN présent en très petite quantité dans un échantillon apporte de nombreux avantages, notamment :

- pas d'extraction de l'ADN préalablement à son dosage,
- 20 • pas d'utilisation obligatoire de marqueur "chaud" c'est-à-dire radioactif,
- pas d'appareillage spécifique lourd,
- grande sensibilité,
- mise en oeuvre simultanée sur plus de cent échantillons, et
- obtention de résultats en quelques heures.

25 Un tel procédé a donc un but bien déterminé qui est le dosage de l'ADN en vue de déterminer les éventuelles variations du taux d'ADN, plus particulièrement chez l'homme mais aussi en conditions expérimentales pour quantifier les phénomènes de mort cellulaire.

On connaît un test décrit par Wood et coll [1988] Cell, 53, 97-106] et 30 Sancar et coll. [Sibghat-Ullah et al (1989) Nucleic Acids Res., 17, 4471 - 4484], qui permet de détecter les lésions sur de l'ADN.

Cet essai consiste à placer deux plasmides très purs et de tailles différentes, l'un lésé et l'autre non lésé en tant que référence, en présence d'un extrait cellulaire, transcriptionnellement actif, en présence, entre autres, d'une composition connue de dNTP, de dATP marqué et de Magnésium.

5 Les lésions sont reconnues, incisées, et la synthèse d'ADN réparatrice subséquente permet l'incorporation de dNTP radio-marqués dont la présence sera ensuite quantifiée.

Un certain pourcentage de lésions est réparé par ce mécanisme d'incision-excision et resynthèse, de l'ordre de 7 %.

10 On linéarise les plasmides, on fait migrer sur un gel d'électrophorèse afin d'assurer la séparation et on étudie le signal radioactif émis par les chaînes réparées dans lesquelles un marqueur "chaud" est présent. Le rapport des signaux donne un rapport de réparation.

L'activité d'incision-excision peut aussi être directement mesurée
15 [Calsou et Salles (1994) Biochem.Biophys.Res.Comm.,202. 788-795].

Un tel test présente de nombreux inconvénients et notamment le fait que l'application à l'industrie dans des conditions d'automatisation satisfaisantes est difficile si bien que cet essai reste réservé aux laboratoires. Les délais d'obtention des résultats, (de l'ordre de deux jours), sont trop
20 longs et les coûts trop élevés. Comme autre contrainte, on peut citer la nécessité de disposer de plasmides purifiés, avec des quantités de l'ordre 200-300 ng et à ce sujet, on remarque que ce test ne paraît pas transposable à l'analyse de lésions d'ADN de toute provenance *in vitro* ou *ex vivo*.

De plus on constate que les marqueurs sont des isotopes dont la
25 manipulation est moins aisée et que le remplacement par des marqueurs d'autre nature semble délicat.

En outre, dans le domaine des marqueurs, une tendance forte est de penser que les marqueurs radioactifs sont plus sensibles que les autres si bien que tout chercheur est amené instinctivement à recourir à de tels
30 marqueurs et même à être dissuadé d'utiliser des marqueurs froids.

On connaît bien sûr des tests permettant ensuite de détecter les mutagènes puisqu'une relation existe entre lésions et mutagénèse. Ce sont

plus particulièrement le test d'AMES [Ames et al (1973) Proc.Natl.Acad.Sci .USA,70,2281-2285)] complété par le test dit du micronoyau [Mac Grégor et al. (1987) Mutat. Res. 189,103-112] qui permet l'analyse des cassures chromosomiques et des tests permettant de détecter des mutations dans des 5 gènes tels que HPRT codant pour une enzyme de biosynthèse des bases de l'ADN.

Dans l'industrie pharmaceutique, on utilise très souvent et surtout en cas de doute avec les tests précédents, le test UDS "Unscheduled DNA Synthesis" qui consiste également à mesurer l'incorporation d'un ou plusieurs 10 nucléotides marqués dans l'ADN de cellules soumises à des agents potentiellement génotoxiques.

Ce test présente à nouveau l'inconvénient de prévoir la manipulation de radio-isotopes et d'être semi-quantitatif.

Un perfectionnement de l'UDS a proposé un marqueur non radioactif 15 [Selden et al.(1994) Mutat.Res.,315, 147-167], mais cet intérêt est rendu moins pertinent par le fait que l'analyse des résultats nécessite la mise en oeuvre de la cytométrie de flux, qui est une technique très lourde.

Le procédé selon l'invention a donc pour but de pallier les inconvenients de l'art antérieur en permettant de déterminer qualitativement 20 et quantitativement les lésions induites dans de l'ADN, qu'il provienne de cellules ex vivo (cellules, tissus) ou qu'il s'agisse d'ADN in vitro (purifié ou issu de cellules en culture). Le procédé selon l'invention permet aussi de déterminer la capacité d'une substance ou d'un mélange de substances à inhiber l'effet lésant d'un produit lésant.

25 Le procédé selon l'invention permet également de tester des agents modulateurs de la réparation.

En effet, la modulation, plus précisément l'inhibition de l'activité réparatrice de l'ADN d'une cellule est une voie thérapeutique du traitement de cancers. On cherche ainsi à développer des molécules présentant des 30 propriétés d'inhibition de la réparation de l'ADN.

Aussi pourrait-il être très utile de tester de telles molécules, ce qui permettrait de les cribler rapidement et de ne retenir que les plus efficaces pour des études plus poussées.

C'est donc l'objet aussi de l'invention de proposer de mesurer la modulation, par une molécule ajoutée au mélange de réparation, de l'efficacité de réparation d'un ADN prétréssé, donnant un signal de réparation significatif, en l'absence de ladite molécule.

De plus la présente invention permet par une mise en oeuvre d'une étape supplémentaire spécifique de traiter directement des cellules par un produit chimique lésant et de déterminer, toujours qualitativement et quantitativement, les lésions subies par l'ADN de ladite cellule.

Le procédé contribue à simplifier ce type d'étude des lésions, il peut être automatisé ce qui lui donne une connotation industrielle certaine, il s'applique à tous types d'ADN et sur des quantités très réduites grâce à une très grande sensibilité du test.

La rapidité de la réponse est également un avantage prépondérant, notamment pour l'industrie, puisque l'ordre de grandeur est de quelques heures.

La possibilité d'utilisation de marqueurs "froids" et la non nécessité de recourir à des marqueurs "chauds" tout en la laissant possible est un avantage supplémentaire. Ceci a pour corollaire l'emploi d'un matériel spécifique pour la lecture certes, matériel qui correspond au marqueur incorporé mais ces appareillages sont d'un usage courant et d'une mise en oeuvre relativement simple pour l'homme de l'art, sans commune mesure avec un appareil de cytométrie de flux.

Enfin, on peut noter comme avantage évident la possibilité d'analyser simultanément un nombre d'échantillons beaucoup plus important, avec un coefficient proche de 10.

On entend pour la suite de la description les définitions complémentaires suivantes :

Support sensibilisé : tout support notamment solide y compris la gélatine, ayant été traité par des substances présentant une très forte affinité pour le matériel nucléique (ADN ou ARN).

5 Extrait cellulaire : extrait cellulaire partiellement purifié, composants purifiés et isolés avec recombinaison éventuelle au sein d'une composition de certains de ces composants purifiés ou encore composant obtenu par biologie moléculaire.

10 Marqueur : nucléotide modifié avec un marqueur radioactif ou non radioactif, du type greffé chimiquement.

15 A cet effet, le procédé de détection qualitative et quantitative de lésions sur de l'ADN, caractérisé en ce que les étapes sont réalisées directement sur un support sensibilisé sur lequel l'ADN lésé est fixé:

- action d'une composition comprenant au moins un extrait cellulaire possédant une activité réparatrice sur cet ADN, ledit extrait contenant 15 des marqueurs,
- révélation directe ou indirecte des marqueurs éventuellement incorporés dans l'ADN, en cas de réparation, et
- lecture comparative par rapport à un échantillon de contrôle lesdites étapes étant séparées par au moins une étape de lavage.

20 Plus précisément, le procédé se caractérise en ce qu'il comprend les différentes étapes suivantes:

- fixation de l'ADN cible sur un support sensibilisé,
 - action d'une composition à tester comprenant au moins un produit lésant,
 - action d'une composition comprenant au moins un extrait cellulaire possédant une activité réparatrice sur cet ADN, ledit extrait contenant des marqueurs, et
 - révélation directe ou indirecte des marqueurs éventuellement incorporés dans l'ADN, en cas de réparation, et
 - lecture comparative par rapport à un échantillon de contrôle
- 30 Selon un autre mode de mise en oeuvre, les étapes sont les suivantes :

- action d'une composition à tester comprenant au moins un produit lésant,
- fixation de l'ADN cible sur un support sensibilisé,
- action d'une composition comprenant au moins un extrait cellulaire possédant une activité réparatrice sur cet ADN, ledit extrait contenant des marqueurs,
- révélation directe ou indirecte des marqueurs éventuellement incorporés dans l'ADN, en cas de réparation, et
- lecture comparative par rapport à un échantillon de contrôle.

10 L'invention propose aussi un procédé de mesure de l'effet de modulation de l'effet inhibiteur de la réparation d'au moins une molécule, qui comprend les étapes suivantes :

- préparation d'ADN lésé fixé sur un support sensibilisé,
- action d'une composition comprenant au moins un extrait cellulaire possédant une activité réparatrice sur cet ADN, ledit extrait contenant des marqueurs, et conjointement action d'au moins une molécule ayant un pouvoir modulateur de l'action de réparation,
- révélation directe ou indirecte des marqueurs éventuellement incorporés dans l'ADN, en cas de réparation, et
- lecture comparative par rapport à un échantillon de contrôle.

20 Selon un mode de réalisation tout à fait préférentiel, le support est un support solide, notamment une plaque de microtitration à puissances ou des billes de "latex".

Le support est sensibilisé par des substances présentant une très forte affinité vis à vis de l'ADN de façon à provoquer une fixation de cet ADN par adsorption.

25 Ces substances sont choisies parmi les substances cationiques ou les protéines, au pH utilisé pour l'adsorption du matériel nucléique.

Les substances cationiques sont plus particulièrement choisies parmi les polyacides aminés de type polylysine ou polyarginine, lévogyre, dextrogyre ou lévogyre/dextrogyre.

Dans le cas de la polylysine, son poids moléculaire retenu se situe dans la fraction 15 000 à 30 000 Daltons.

Selon un mode de mise en oeuvre particulier, la sensibilisation du support est réalisée par incubation en tampon phosphate 10mM, chlorure de sodium 137 mM et un pH compris entre 6,5 et 8, plus particulièrement 7,2.

De façon préférentielle, le produit lésant, dans le cas d'un produit lésant chimique, est dilué dans une solution tamponnée et bioactivé.

Un exemple de solution de lavage est une solution en tampon phosphate 10 mM, chlorure de sodium 137 mM et un tensioactif non ionique, 10 par exemple du "Tween 20" en proportion égale 0,05 à 0,15 % et plus particulièrement 0,1%.

Selon l'invention le procédé peut aussi être mis en oeuvre pour la capture de l'ADN issu directement à partir de cellules vivantes traitées et comprend les étapes suivantes :

- 15 • action d'un produit lésant directement sur les cellules,
 • lyse des cellules dans une solution,
 • fixation de l'ADN sur un support sensibilisé.

Cette lyse des cellules dans la solution adaptée s'effectue en présence du support sensibilisé.

20 A partir de cellules vivantes traitées, le procédé se caractérise aussi par les étapes suivantes :

- action d'un extrait cellulaire possédant une activité réparatrice sur cet ADN, ledit extrait contenant des marqueurs,
 • révélation directe ou indirecte des marqueurs éventuellement incorporés dans l'ADN, en cas de réparation,

lesdites étapes étant séparées par au moins une étape de lavage.

Le présent procédé de détermination des lésions d'ADN et le procédé associé de capture et de purification de l'ADN en vue de la détermination des lésions, ainsi que la détermination et la mesure de l'effet modulateur de la 30 réparation sont décrits ci-après, assortis d'exemples d'essais réalisés avec les résultats obtenus.

10

Les graphes annexés permettent d'illustrer la description du procédé selon l'invention en association avec les résultats indiqués dans la description qui va suivre, et les figures de ces dessins représentent :

- figures 1A à 1F, un schéma illustrant les étapes du procédé, les 5 figures 1A', 1B' et 1C' correspondant à une variante de l'ordonnancement de certaines étapes,
- figure 2, graphe du rapport du taux de capture de l'ADN par adsorption en pourcentage sur un support rigide sensibilisé à la polylysine par rapport à un support non sensibilisé,
- 10 • figure 3, graphe de la cinétique de réparation d'ADN lésé,
- figure 4, graphe du rapport de réparation en fonction de la quantité d'extrait cellulaire,
- figure 5, graphe du rapport de réparation en fonction de la concentration de KCl,
- 15 • figure 6, graphe du rapport de réparation en fonction de différentes doses de produit lésant, en l'occurrence des rayons ultraviolets,
- figure 7, graphe du rapport de réparation en fonction de la dose de méthylimethanesulfonate (MMS) ajouté avant ou après adsorption de l'ADN dans le puits,
- 20 • figure 8, graphe du rapport de réparation en fonction de la dose de 1-méthyl-3-nitro-1-nitroso-guanidine (MNNG) incubé avec l'ADN dans un solvant organique avant adsorption dans le puits, et
- figure 9, un graphe montrant les valeurs de l'effet inhibiteur de différentes molécules sur l'activité de réparation d'extraits cellulaires.

25 Les essais menés à l'aide du procédé selon l'invention ont consisté à réaliser les étapes suivantes a/ à f/, représentées schématiquement sur les figures 1A à 1F et détaillées ci-après :

Figures 1A - 1B : préparation et adsorption de l'ADN sur des puits sensibilisés

30 a/ Un plasmide 2959 bp résistant à l'ampicilline est préparé par la méthode de lyse alcaline à partir d'*Escherichia coli*, JM109, suivi, par exemple, par une chromatographie sur colonne Qiagen..

b/ Préparation d'un support solide, en l'occurrence une plaque de microtitration à puits du type Microlite II, commercialisée par la société Dynatech.

Les puits de cette plaque sont ensuite sensibilisés pendant une nuit avec
5 50 µL de poly-L-lysine dans la fraction moléculaire comprise entre 15 000 et 30 000 Daltons dans une solution tampon phosphate avec un sel, ceci à une température de 4°C.

Cette plaque est lavée deux fois avec une solution de lavage comprenant un tampon phosphate avec un sel auquel on rajoute un tensioactif non-ionique, du "Tween 20", dans une proportion de 0,1%.

Pour la fixation de l'ADN sur la plaque, la solution d'ADN est soumise à une agitation douce pendant 30 minutes à 30°C, puis lavée deux fois avec une solution de lavage identique à la solution de lavage des plaques

15 Figure 1C : formation de dommages à l'ADN par l'action du produit lésant

c/ Génération de lésions sur l'ADN ainsi adsorbé, avec un rayonnement ultraviolet germicide à 254 nm. Le taux d'émission est mesuré par un dosimètre pour rayonnement ultraviolet et le rayonnement est émis avec des puissances comprises entre 50 et 600 J/m².

20 Des agents alkylants sont dilués en tampon phosphate 10 mM, au pH 7,2 et incubés avec l'ADN pendant 1 heure à 30°C.

Figures 1A' - 1B' : Préparation et action d'un produit lésant sur de l'ADN

a'/ On peut aussi en variante inverser les étapes de lésion et de fixation. Un
25 plasmide est préparé de façon identique à celle du a/.

b'/ Durant cette phase, l'ADN lésé est obtenu soit en incubant en phase aqueuse ou dans un solvant organique de l'ADN plasmidique avec au moins une substance génotoxique, soit en purifiant l'ADN génomique de cellules prétraitées avec au moins une substance génotoxique. Par
30 exemple, du monoazide d'éthidium est dissout dans une solution 10 mM Tris-HCl, 1 mM acide éthylènediamine tétra-acétique et incubé avec

l'ADN ($80\mu\text{g}/\text{ml}$) avec différents rapports molaires (drogue/nucléotide) compris entre 1.10^{-3} et 4.10^{-2} pendant 10 minutes et soumis ensuite pendant 270 secondes à l'action d'une lampe ballon de 500 W.

A la suite de ce traitement chimique, l'ADN est, par exemple, précipité 5 à l'éthanol.

Figures 1C': adsorption de l'ADN sur des puits sensibilisés

c'/ Au cours de cette étape, l'ADN lésé est fixé sur les puits d'une plaque 10 support sensibilisé de microtitration de la même façon qu'à l'étape b/.

Les étapes suivantes sont communes aux deux modes de réalisation qui viennent d'être présentés.

15 Figure 1D : réaction de réparation et incorporation de DIG-11 dUMP aux sites de dommage, en présence d'un extrait cellulaire

d/ Réparation en présence d'un extrait cellulaire et d'agents de type connu, comprenant, par exemple, pour un volume de milieu réactionnel (MR), de 50 μl :

- 20 • 150 μg d'extraits protéiniques extraits de cellules HeLa,
 • 50 mM de KCl dans un milieu tampon contenant 40 mM Hepes-KOH (pH 7,6),
 • 5 mM de MgCl_2 , 0,5 mM de DTT, 10 mM de phosphocreatine, 2,5 μg de phosphocréatine kinase, 2 mM EGTA, 3,4% de glycérol, 18
25 μg d'albumine sérique bovine, 0,4 μM de dGTP, de dCTP, de dATP et de DIG-11 dUTP.

Cette réparation est obtenue par une incubation de 3 heures à 30°C et les puits sont lavés trois fois avec la même solution que précédemment.

Figure 1E : incubation avec un anticorps anti-DIG conjugué à la phosphatase alkaline et reconnaissance de l'anti-DIG par l'anticorps suivie d'une incubation avec un agent luminescent

e/ L'ADN marqué est incubé 30 minutes avec un anticorps anti-digoxygénine couplé associé à une phosphatase alcaline diluée à 1/10 000 dans un tampon phosphate avec sel, plus 0,025% d'albumine sérique bovine acétylée et 0,1% de "Nonidet P40". Les plaques sont lavées trois fois avec la même solution que précédemment.

10 Figure 1F : émission de la lumière due à la déphosphorylation enzymatique du "Lumi-Phos 530"

f/ Incubation avec un substrat chimioluminescent, "Lumi-Phos 530", pendant 15 minutes et mesure de la lumière émise avec un luminomètre ("Luminoskan") et exprimée en unités relatives de lumière (Relative Light Unit, RLU).

On a pu constater que les plaques sensibilisées avec de la polylysine permettent l'adsorption d'ADN alors que les plaques test non sensibilisées ne retiennent pas l'ADN après lavage. Ceci est indiqué sur la figure 2, sur laquelle la courbe avec les carrés représente le pourcentage d'accrochage de l'ADN sur les plaques avec polylysine tandis que la courbe avec des cercles représente le pourcentage d'accrochage de l'ADN sur les plaques non sensibilisées.

Ces courbes sont obtenues par une mesure de la radioactivité utilisant des marqueurs isotopiques, lors d'une manipulation spécifique visant à déterminer uniquement les possibilités d'accrochage de l'ADN. Ces courbes sont le reflet de la moyenne de trois essais successifs.

La saturation de la plaque avec une solution de 50 µl d'ADN est atteinte avec une concentration de 1 à 2 µg/ml d'ADN correspondant à sensiblement à 40-80 ng d'ADN fixé.

30 Ainsi, la fixation sur un support solide tel qu'une plaque de microtitration à puits autorise maintenant les réactions de réparation

permettant de quantifier la capacité de l'ADN à être réparé, comme cela est maintenant décrit.

La présence de lésions de l'ADN est détectée par la réaction de réparation par excision adaptée en milieu in-vitro.

5 Après incubation de l'ADN lésé et de l'ADN non lésé en présence d'un extrait cellulaire, on peut déterminer le rapport de réparation par chimioluminescence.

Dans toutes les figures faisant état d'un rapport de réparation, celui-ci est défini comme le rapport du signal brut luminescent obtenu pour une 10 condition "test" sur le signal obtenu avec un ADN contrôle non traité.

Les essais ont consisté à faire varier les paramètres suivants : temps d'incubation, importance de la lésion, concentration de l'extrait cellulaire, concentration en sels, ou quantité d'ADN, de façon à optimiser la réaction de réparation.

15 Ainsi, la cinétique de réparation avec un extrait cellulaire HeLa, représentée par le graphe de la figure 3, montre que le maximum de réparations est obtenu en 3 heures, durée à l'issue de laquelle la cinétique de réparation stagne.

Ainsi, avec un ADN ayant été soumis à une dose de 300 J/m² de 20 rayonnement ultraviolet, le maximum de synthèse de réparation de lésions est obtenu en présence de 300µg d'extrait cellulaire, comme le confirme la figure 4.

Afin d'optimiser encore la synthèse réparatrice, la figure 5 montre des essais avec différentes concentrations de sel, en l'occurrence du chlorure de 25 potassium, KCl. La courbe présente un maximum avec 70 mM de KCl.

Pour la suite des essais, les valeurs optimales retenues sont :

- durée d'incubation : 3 heures,
- quantité d'extrait cellulaire : 150 µg, et
- 70 mM de KCl.

30 Le procédé selon l'invention consiste ensuite à révéler les lésions ainsi générées et deux possibilités sont offertes, la première dans laquelle les

lésions sont générées préalablement à l'étape d'adsorption et, la seconde, dans laquelle les lésions sont générées postérieurement à l'étape d'adsorption.

Sur la figure 6, la courbe avec les carrés correspond à la soumission de l'ADN au rayonnement ultraviolet avant l'étape d'adsorption et la courbe avec les cercles correspond à la soumission de l'ADN au rayonnement ultraviolet après l'étape d'adsorption.

Des résultats similaires ont été trouvés en ce qui concerne le rapport de réparation des lésions.

De façon complémentaire, d'autres essais ont été menés en utilisant comme produit lésant des composés génotoxiques qui conduisent notamment à la formation d'adduits.

De la même façon que pour un traitement de l'ADN aux rayons U.V., la formation de lésions de type adduits détectées par le test selon l'invention peuvent avoir été produites sur de l'ADN adsorbé dans le puits ou préalablement à l'adsorption comme cela est montré sur les figures 7 et 8.

Sur la figure 7, on a traité l'ADN avec un agent alkylant le méthyliméthanesulfonate (MMS) qui induit des lésions par fixation covalente.

Dans le cas de la courbe avec les carrés, on a traité l'ADN une fois qu'il a été adsorbé dans le puits et dans le cas de la courbe avec les ronds, on a traité préalablement l'ADN en phase liquide avec le MMS puis on l'a adsorbé dans le puits.

On peut constater que dans cet exemple, une mise en contact de l'ADN avec le MMS avant l'étape d'adsorption permet un efficacité de lésions supérieure comme en témoigne le rapport de réparation.

Sur la figure 8, on a testé l'effet-dose du 1-méthyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG), agent génotoxique connu, de référence. Dans ce cas, on a préincubé l'ADN cible avec des doses croissantes de MNNG dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). Ceci montre que l'on peut déetecter de façon dose-dépendante ce génotoxique.

On peut remarquer que le procédé sur plaque selon l'invention est un test d'une grande sensibilité puisque la détection est opérée sur 40 ng d'ADN au lieu de 200 à 300 ng, dans le cadre d'un travail en tube.

De plus, le test selon l'invention peut être automatisé.

5 Ce même test peut également être utilisé pour cribler des composés génotoxiques, certains d'entre eux pouvant être activés par des enzymes. De même, on peut tester l'action de composés oxydants comme l'effet inhibiteur d'agents antioxydants.

Des essais ont été menés avec des lésions générées par deux types
10 d'agents oxydants :

- du peroxyde d'hydrogène H₂O₂,
- du bleu de méthylène.

a/ Le peroxyde d'hydrogène est connu pour produire des radicaux libres par la réaction de FENTON. Des plaques de microtitration à puits comportant de l'ADN fixé sont incubées pendant différentes périodes de temps avec des quantités variables de peroxyde d'hydrogène dilué en solution tampon phosphate à 37°C. Des essais ont montré que le rapport maximum de réparation est obtenu pour une quantité de 0,27 mM de peroxyde d'hydrogène, soit une dilution de 1,6.10⁻⁴ de H₂O₂ à 30 %. Les plaques sont ensuite rincées deux fois avec la même solution de lavage que précédemment utilisant le tensioactif non ionique "Tween 20" à raison de 0,1%.

b/ Le bleu de méthylène est connu pour libérer par photoactivation, un atome d'oxygène.

25 Pour les essais à suivre, le bleu de méthylène a été soumis à un rayonnement en lumière visible pendant 20 minutes avec deux lampes ballons de 100 W, une distance entre les lampes et les plaques support de 30 cm et une concentration de bleu de méthylène de 15 ng/ml.

30 L'étape de réparation des lésions est réalisée suivant l'enseignement indiqué ci-dessus, à l'aide du même milieu réactionnel MR.

De la même façon, les plaques, après action du milieu réactionnel MR sont lavées trois fois avec la solution de lavage précédemment indiquée et incubées 15 minutes avec un substrat chimioluminescent ("Lumi-Phos 530").

Connaissant les actions de tels oxydants sur l'ADN, les essais ont permis de tester l'efficacité de composés antioxydants en analysant la luminescence correspondant à la réparation qui doit être d'autant plus faible que l'antioxydant est efficace.

Pour le premier essai, comme la production de radicaux libres à partir du peroxyde d'hydrogène requiert la présence de fer, il a été utilisé un chélatant métallique, mésylate déferroxamine, afin de vérifier si la production de lésions peut être inhibée. On a pu constater que 10 µM de ce chélatant métallique inhibent totalement les effets du peroxyde d'hydrogène.

Pour le second essai, avec le bleu de méthylène, on a calculé l'activité relative AR d'un antioxydant qui est égale à :

15

(contrôle RLU - test RLU)

AR = _____

(contrôle RLU - référence RLU)

formule dans laquelle :

- contrôle RLU correspond à la valeur du signal du bleu de méthylène seul soumis au rayonnement,
- test RLU correspond à la valeur du signal du bleu de méthylène soumis au rayonnement ultraviolet plus une molécule antioxydante, et
- référence RLU correspond à la valeur du signal de la molécule antioxydante seule.

25 Les calculs montrent ainsi que cela est regroupé dans le tableau suivant que la silymarine présente une haute activité antioxydante tandis que le plasma et la vitamine A n'ont aucun effet antioxydant.

silymarine (mM)	A.R. (avec BM)	A.R. (avec H ₂ O ₂)	vitamine C (µM)	A.R. (avec BM)	A.R. (avec H ₂ O ₂)
10 ⁻⁵	0,44	ND	10 ⁻⁵	0,22	0,12
10 ⁻⁴	0,47	ND	10 ⁻⁴	0,39	0,20
10 ⁻³	0,43	ND	10 ⁻³	0,21	0,19

18

10^{-2}	0,49	ND	10^{-2}	0,24	0,30
10^{-1}	0,94	0,66	10^{-1}	0,28	0,45
1	1	1	1	-1,2 (a)	0,56
Vitamine A (μ M)	A.R. (avec BM)	A.R. (avec H_2O_2)	Plasma (dilution)	A.R. (avec BM)	A.R. (avec H_2O_2)
10^{-4}	0,07	0,06	$3 \cdot 10^{-6}$	0	0
10^{-3}	0,24	0,15	$1 \cdot 10^{-5}$	0,07	0,40
10^{-2}	0,25	0,20	$2 \cdot 10^{-5}$	0,12	0,69
10^{-1}	0,14	0,21	$5 \cdot 10^{-5}$	0	0,85
1	0,21	0,18	$2 \cdot 10^{-4}$	0	0,95
10	0,18	0,20	$4 \cdot 10^{-4}$	0	0,98

(a) une valeur négative signifie que la valeur test est supérieure à la valeur référence

ND : non déterminé

BM : bleu de méthylène

Au cours de l'étape de réparation, voir figure 1D, des molécules pour 5 lesquelles on cherche à mettre en évidence un effet modulateur de la réparation peuvent être ajoutées. ces molécules sont préférentiellement diluées dans l'eau ou dans du diméthylsulfoxyde (DMSO).

Sur la figure 9, on a montré la mesure de l'effet inhibiteur dose-dépendant de la réparation par deux molécules antitumorales poisons de 10 topoisomérase II, à savoir l'actinomycine D (courbe avec les carrés) et la doxorubicine (courbe avec les triangles) sur des extraits issus de cellules HeLa.

Par contre, l'acide nalidixique, inhibiteur de la sous-unité gyrA de la gyrase d'E.coli (courbe avec les ronds) est sans effet sur l'activité de ces 15 extraits issus de cellules HeLa.

Ceci montre qu'au moyen du procédé selon l'invention, de façon simple et surtout très rapide, on peut tester l'effet d'un agent particulier ou la combinaison d'agents modulant l'activité réparatrice d'extraits cellulaires.

On peut aussi capter l'ADN directement à partir de cellules ayant subies l'action d'un composé susceptible d'induire des lésions sur l'ADN de ces cellules, par exemple un génotoxique, ou un mélange de composés.

Parmi les composés, on peut citer les produits oxydants car ils 5 génèrent des radicaux libres de type oxygène singulet $^1\text{O}_2$, et le radical hydroxyl OH $^\bullet$, comme cela a été indiqué lorsque les tests sont produits directement sur de l'ADN fixé sur support solide.

On opère de la même façon que précédemment pour l'analyse des lésions et la détection mais le problème posé est la capture de l'ADN.

10 Selon l'invention, les cellules sont donc soumises à l'action du composé à tester, par exemple un agent génotoxique puis, après une durée d'incubation variable, en présence de cet agent génotoxique, les cellules sont incubées en présence d'un agent de lyse directement dans les puits d'une plaque de microtitration sensibilisée, afin de capter l'ADN ainsi généré, qui 15 doit être analysé.

On peut citer comme composition de lyse une solution en tampon phosphate 10 mM, chlorure de sodium 137 mM, urée 5 à 20% (préférentiellement 10%), bromure d'hexadecyltrimethyl ammonium 0,1 à 0,5% (préférentiellement 0,2%), protéinase K, de 200 à 500 µg/ml.

20 L'étape de lyse est comprise entre 30 minutes et 2 heures.

On a ainsi pu fixer de l'ADN sur un support solide, concomitamment à la lyse des cellules, et cet ADN peut ensuite subir toute analyse nécessitant sa mise sur support.

En particulier, on peut analyser les lésions éventuellement subies, en 25 appliquant à cet ADN l'étape de réparation et de marquage à froid ou à chaud et l'étape de révélation qualitative et quantitative, telles qu'elle viennent d'être décrites précédemment dans la description.

Dans ce cas, les lavages sont effectués de la même façon que précédemment, avec une solution adaptée, puis les puits de la plaque sont 30 incubés avec un extrait cellulaire en vue de permettre une éventuelle réparation.

La révélation, notamment par chimioluminescence dans le cas d'un recours à des marqueurs froids de ce type, permet l'étude des lésions générées sur l'ADN lorsque la cellule qui le porte est soumise à l'action d'un composé à tester.

5 Ce procédé de capture et de fixation de l'ADN sur un support solide est utile pour de nombreuses applications.

En effet, il s'applique plus généralement :

- à la capture et à la purification d'ADN ou d'ARN en vue d'amplifier enzymatiquement des séquences nucléotides particulières,
- 10 • à la capture d'ADN de cellules soumises à des agents génotoxiques en vue d'une analyse par un test UDS avec marqueur froid ou encore,
- à la capture et à l'analyse des coupures sur l'ADN de cellules soumises à un stress chimique ou physique.

15 Un tel procédé présente un intérêt pris isolément et plus particulièrement dans le cas du procédé d'analyse précédemment indiqué. On remarque qu'il nécessite une faible de quantité de matière initiale, ainsi, l'ADN génomique provenant de 10^4 à 10^5 cellules peut être capté et les lésions quantifiées lorsque la cellule a été traitée par un génotoxique
20 quelconque.

REVENDEICATIONS

=====

1. Procédé de détection qualitative et quantitative de lésions sur de l'ADN, caractérisé en ce que les étapes sont réalisées directement sur un support sensibilisé sur lequel l'ADN lésé est fixé:

- action d'une composition comprenant au moins un extrait cellulaire possédant une activité réparatrice sur cet ADN, ledit extrait contenant des marqueurs,
- révélation directe ou indirecte des marqueurs éventuellement incorporés dans l'ADN, en cas de réparation, et
- lecture comparative par rapport à un échantillon de contrôle

10 lesdites étapes étant séparées par au moins une étape de lavage.

2. Procédé de détection qualitative et quantitative de lésions sur de l'ADN selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les différentes étapes suivantes:

- fixation de l'ADN cible sur un support sensibilisé,
- action d'une composition à tester comprenant au moins un produit lésant,
- action d'une composition comprenant au moins un extrait cellulaire possédant une activité réparatrice sur cet ADN, ledit extrait contenant des marqueurs, et
- révélation directe ou indirecte des marqueurs éventuellement incorporés dans l'ADN, en cas de réparation, et
- lecture comparative par rapport à un échantillon de contrôle

20 3. Procédé de détection qualitative et quantitative de lésions sur de l'ADN selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les 25 différentes étapes suivantes:

- action d'une composition à tester comprenant au moins un produit lésant,
- fixation de l'ADN cible sur un support sensibilisé,

- action d'une composition comprenant au moins un extrait cellulaire possédant une activité réparatrice sur cet ADN, ledit extrait contenant des marqueurs,
- révélation directe ou indirecte des marqueurs éventuellement incorporés dans l'ADN, en cas de réparation, et
- lecture comparative par rapport à un échantillon de contrôle.

5 4. Procédé de mesure de l'effet modulateur de la réparation d'au moins une molécule selon la revendication 1, 2 ou 3, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 10 • préparation d'ADN lésé fixé sur un support sensibilisé,
- action d'une composition comprenant au moins un extrait cellulaire possédant une activité réparatrice sur cet ADN, ledit extrait contenant des marqueurs, et conjointement action d'au moins une molécule susceptible d'avoir un pouvoir modulateur de l'action de réparation,
- 15 • révélation directe ou indirecte des marqueurs éventuellement incorporés dans l'ADN, en cas de réparation, et
- détermination de l'effet modulateur de ladite molécule par lecture comparative par rapport à un échantillon de contrôle.

20 5. Procédé de détection qualitative et quantitative de lésions sur de l'ADN selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le support est un support solide.

25 6. Procédé de détection qualitative et quantitative de lésions sur de l'ADN selon la revendication 5, caractérisé en ce que le support solide est une plaque de microtitration à puits ou des billes de "latex".

7. Procédé de détection qualitative et quantitative de lésions sur de l'ADN selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le support est sensibilisé par des substances présentant une très forte affinité vis à vis de l'ADN de façon à provoquer une fixation de cet ADN par adsorption.

30 8. Procédé de détection qualitative et quantitative de lésions sur de l'ADN selon la revendication 7, caractérisé en ce que les substances sont

choisies parmi les substances cationiques ou les protéines, au pH utilisé pour l'adsorption du matériel nucléique.

9. Procédé de détection qualitative et quantitative de lésions sur de l'ADN selon la revendication 8, caractérisé en ce que les substances cationiques sont choisies parmi les polyacides aminés de type polylysine ou polyarginine, lévogyre, dextrogyre ou lévogyre/dextrogyre.

10. Procédé de détection qualitative et quantitative de lésions sur de l'ADN selon la revendication 9, caractérisé en ce que, dans le cas de la polylysine, son poids moléculaire retenu se situe dans la fraction 15 000 à 30 000 Daltons.

11. Procédé de détection qualitative et quantitative de lésions sur de l'ADN selon l'une quelconque des revendications 8, 9 ou 10, caractérisé en ce que la sensibilisation du support est réalisée par incubation en tampon phosphate 10 mM, chlorure de sodium 137 mM et un pH compris entre 6,5 et 8, plus particulièrement 7,2.

12. Procédé de détection qualitative et quantitative de lésions sur de l'ADN selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le produit lésant, dans le cas d'un produit lésant chimique, est dilué dans une solution tamponnée.

20 13. Procédé de détection qualitative et quantitative de lésions sur de l'ADN selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le produit lésant, dans le cas d'un produit lésant chimique, est bioactivé.

14. Procédé de détection qualitative et quantitative de lésions sur de 25 l'ADN selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la solution de lavage est une solution en tampon phosphate 10 mM, chlorure de sodium 137 mM et un tensioactif non ionique.

15. Procédé de détection qualitative et quantitative de lésions sur de l'ADN selon la revendication 14, caractérisé en ce que le tensioactif non- 30 ionique est du "Tween 20" en proportion égale 0,05 à 0,15 % et plus particulièrement 0,1%.

16. Procédé de capture de l'ADN issu directement à partir de cellules vivantes traitées et caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- action d'un produit lésant directement sur les cellules,
- lyse des cellules dans une solution,
- 5 • fixation de l'ADN sur un support sensibilisé.

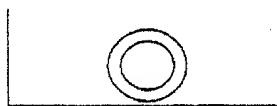
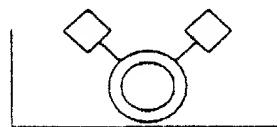
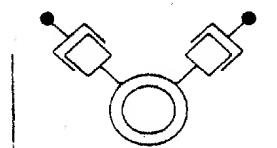
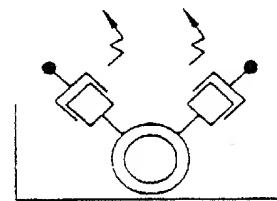
17. Procédé de capture de l'ADN selon la revendication 16, caractérisé en ce que les étapes de lyse et de fixation sont effectuées simultanément, la lyse des cellules dans la solution adaptée s'effectuant en présence du support sensibilisé.

10 18. Procédé de détection qualitative et quantitative de lésions sur de l'ADN issu directement à partir de cellules vivantes traitées, selon la revendication 16 ou 17, et mise en oeuvre des étapes du procédé de détection qualitative et quantitative de lésions sur de l'ADN selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisé en ce qu'il comprend, en 15 autre, les étapes suivantes :

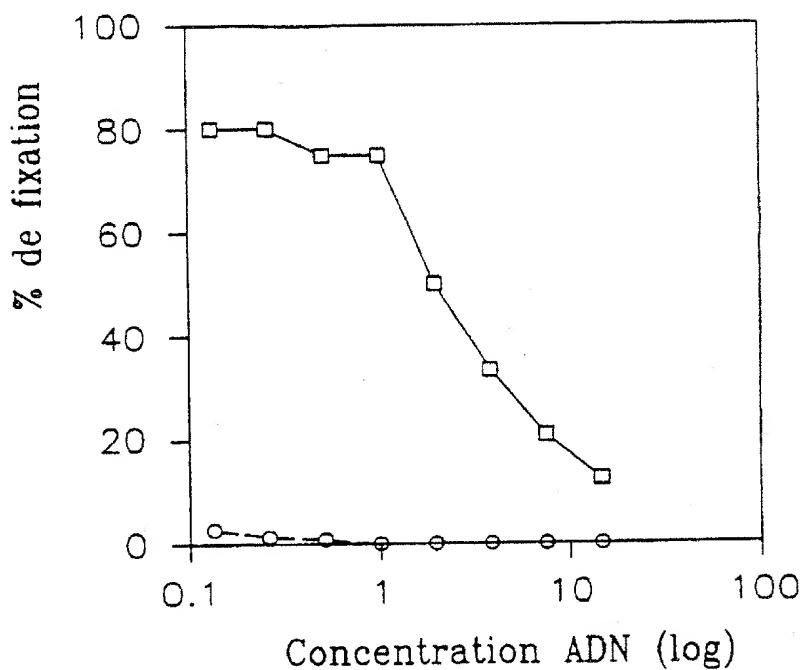
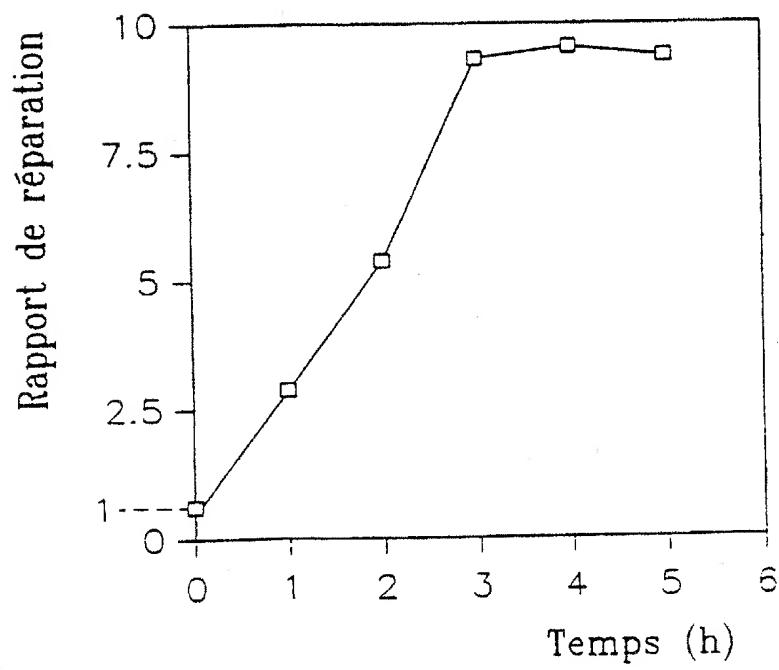
- action d'un extrait cellulaire possédant une activité réparatrice sur cet ADN, ledit extrait contenant des marqueurs,
- révélation directe ou indirecte des marqueurs éventuellement incorporés dans l'ADN, en cas de réparation,

20 lesdites étapes étant séparées par au moins une étape de lavage.

1/6

FIG.1AFIG.1A'FIG.1BFIG.1B'FIG.1CFIG.1C'FIG.1DFIG.1EFIG.1F

2/6

**FIG.2****FIG.3**

3 / 6

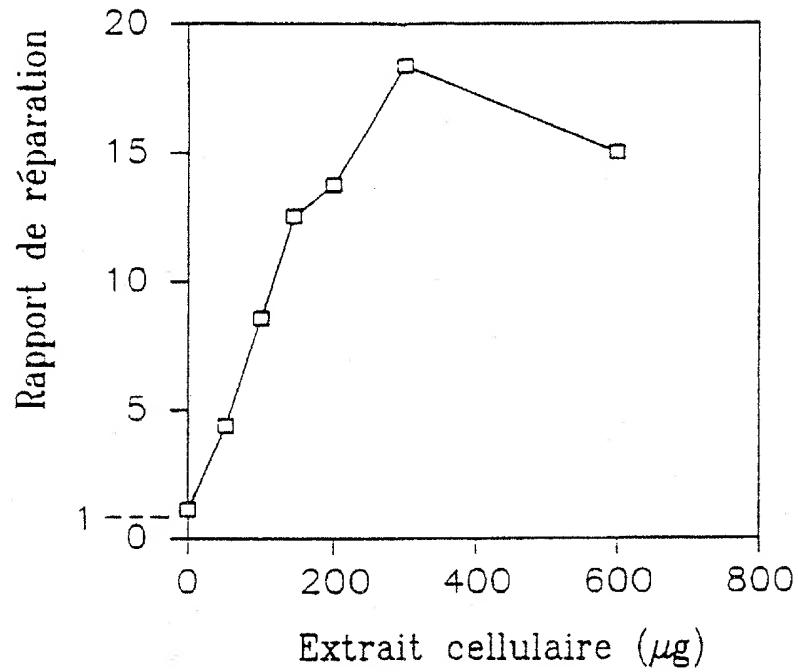


FIG.4

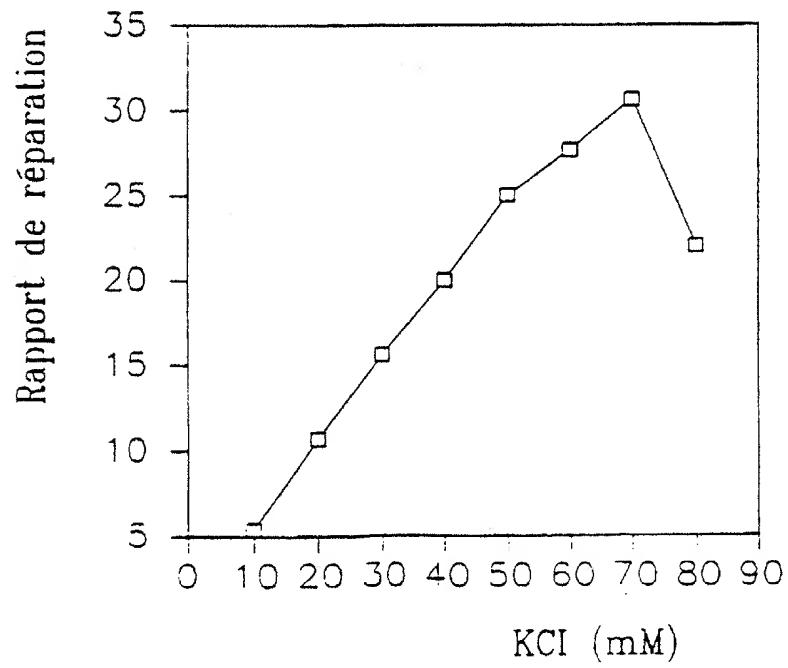


FIG.5

4 / 6

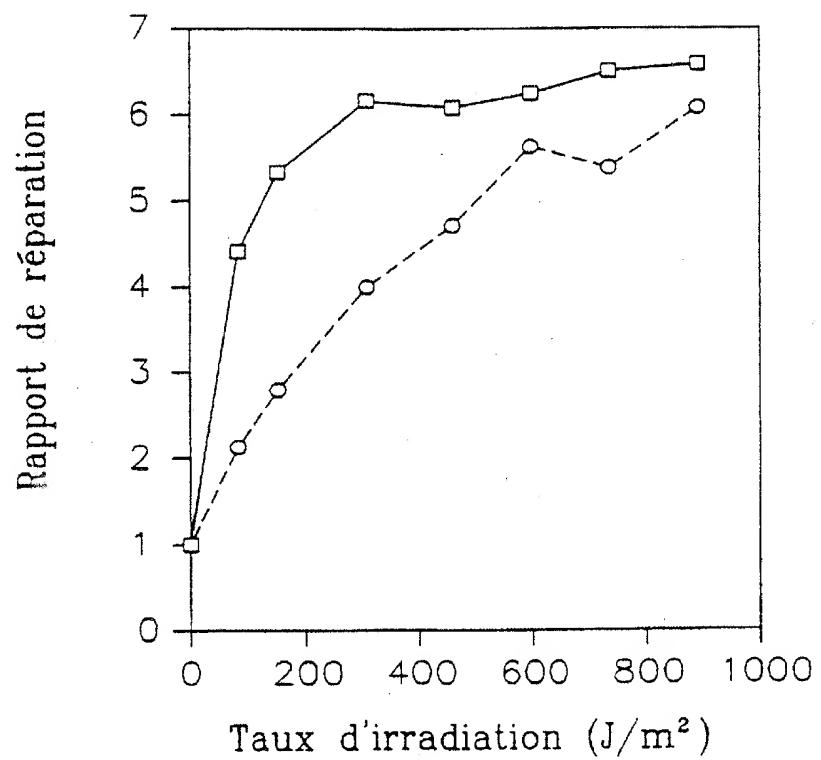
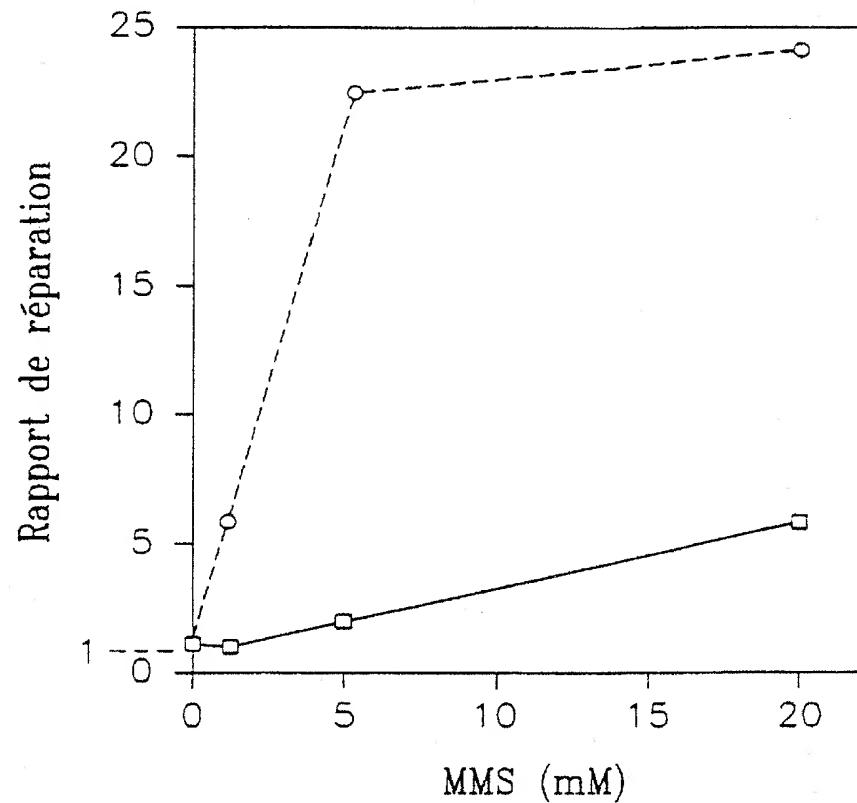
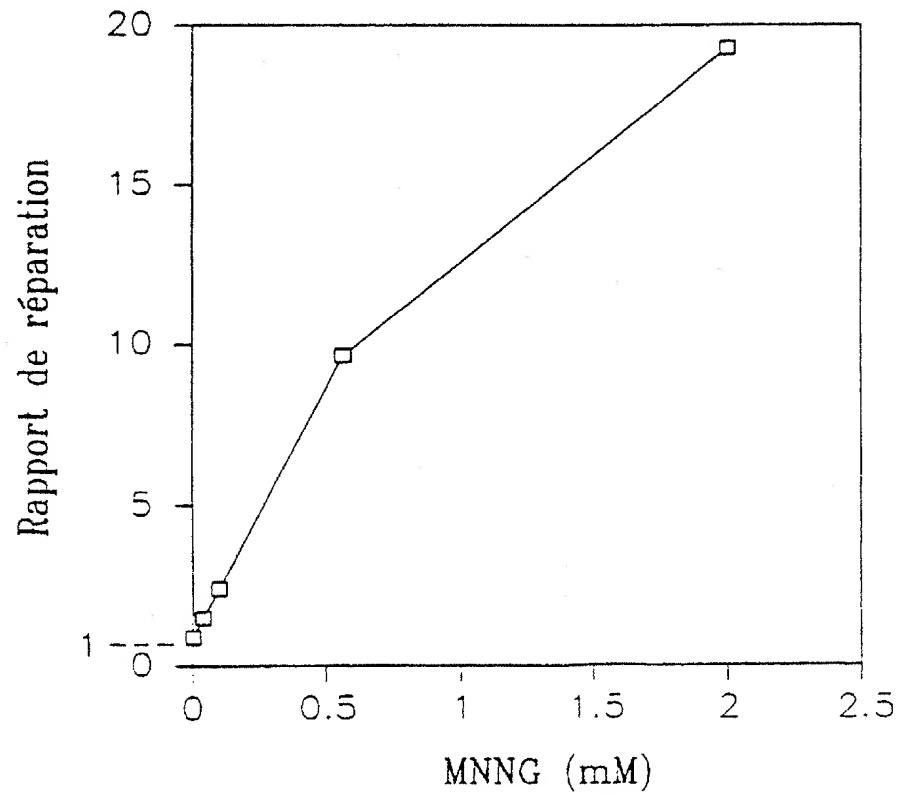


FIG.6

5 / 6

**FIG.7****FIG.8**

6 / 6

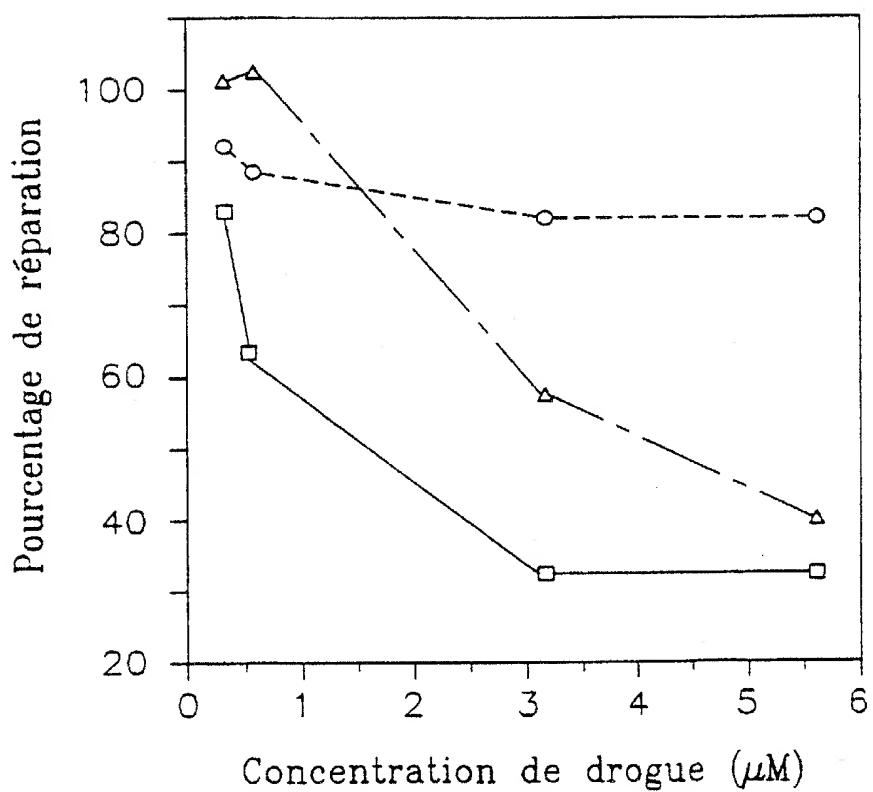


FIG.9